

NBR J63094988

-1- (WPAT)

Title - Hyaluronic acid prodn. - involves using Streptococcus microorganism

Patent Assigned to: - (MEIJ) MEIJI SEIKA KAISHA

Priority- 86.10.08 86JP-237861

NUM - 1 patent(s) 1 country(s)

Patent Number -- JP63094988 A 88.04.26 \* (8822) 3p

AP -- 86JP-237861 86.10.08

IC2 - C12P-019/26

Abstract - JP63094988 A

Culture is applied to a microorganism having hyaluronic acid producing capability belonging to Streptococcus. The viscosity of a culture soln. is controlled to 100 to 800 centipoises, pref. 200 to 600 centipoises during culture processing. This increases the growth amt. of the hyaluronic acid.

The culture soln. comprises; liq. sugar (decomposes starch with amylase), 15.0%, yeast extract, 0.2%, peptone, 2.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3%, Na thiosulphate, 0.2%, Na sulphide, 0.03%. where, % = wt.% or capacity %. The component has a pH of 5.5 to 8.5.

The culture soln. is sterilised by pressure vapour sterilisation. A hyaluronic acid-producing bacterium is inoculated to the soln. Ventilation stirring is applied to the bacterium at 25 to 40 deg. C, pref. 30 to 35 deg. C and at a pH of 6.5 to 8.0, pref. 6.8. Culture is for two to four days. The soln. is centrifuged or filtered to remove the bacterium. Ultrafiltration or dialysis is applied to the filtered soln. to remove a low mol. wt. substance. The soln. is deposited with ethanol and then divided and deposited with a surfactant. The hyaluronic acid obtd. by ion exchange chromatography or gel filtration chromatography is refined.

USE/ADVANTAGE - Efficiently hyaluronic acid prodn..

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-94988

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月26日

C 12 P 19/26  
19/04

8515-4B  
8515-4B※

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造法

⑯ 特 願 昭61-237861

⑰ 出 願 昭61(1986)10月8日

⑱ 発 明 者 武 部 英 日 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

⑲ 発 明 者 松 信 俊 男 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

⑳ 発 明 者 今 井 敏 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

㉑ 発 明 者 窪 田 英 俊 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

㉒ 出 願 人 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号  
最終頁に続く

#### 明 細 書

#### 1. 発明の名称

ヒアルロン酸の製造法

#### 2. 特許請求の範囲

ストレプトコッカス属のヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を通気攪拌培養し、培養中培養液の粘度を100-800センチポイズに制御することによりヒアルロン酸生成量を増大せしめることを特徴とする微生物によるヒアルロン酸の製造法。

#### 3. 発明の詳細な説明

##### 発明の利用分野

本発明は、ヒアルロン酸(Hyaluronic acid)の高収率製造法に関する。

##### 従来の技術

ヒアルロン酸の製造法としては、ホルムストローム(B. Holmstrom, 15, No 6, 1409-1413 Appl. Microbial 1967), ジュー・ビー・ワルコック(J. B. Woolcock 85, 352-373 J. Gen. Microbial 1957), イー・キウム(E. Kjem Acta. Pathol. Mi

crobial, Scand, Seet 84, 162-164, 1976)らによって、また特開昭56-52355, 特開昭58-56692, 特開昭61-63293, 特開昭61-63294などが知られている。

##### 発明が解決しようとする問題点

ストレプトコッカス属のヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を通気攪拌培養して、培養液にヒアルロン酸を蓄積せしめる場合、菌体の経過につれて培養液の粘度は著しく高まる。高粘度の培養液は酸基移動速度を低下させ、また基質および酸・アルカリの分散が均一とならず培養の制御を困難にせしめ生成量の増収が得られない。

##### 問題点を解決するための手段

本発明は前記現状に鑑みてなされたもので、その目的は培養液中の粘度を適正に制御することにより、生産物(ヒアルロン酸)の増収を可能にする方法を提供するものである。培養液の粘度を制御するには温度の変更、pHの変更または希薄剤の添加および水の添加などいずれでもよいが、培養液の粘度を効率よく制御するには、培養液の粘度に応

じて滅菌水を供給する方法は最も効果が大きく、水以外にも糖など栄養基を含んだ水溶液、酸またはアルカリなどを含んだ水溶液などいずれでも良い。水または水溶液の添加に関しては一時的、間歇的または連続的のいずれの供給でも良いが、一時的に大量の水を投入すると菌体への環境を大きく変化させ好ましくない場合もあり、好ましくは培養液の粘度を指標にして水または水溶液を間歇的または連続的に供給し、培養液を希釈することにより粘度を著しく低下させ物質移動速度を高める方法がよい。具体的には粘度100~800センチポイズ好ましくは200~600センチポイズまで希釈する。

本発明に用いるヒアルロン酸生産菌としては、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エクイ(*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・エクイシミリシ(*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ズーエビ

物質を除去する。ついで低分子量物質を除去した濾液をエタノールによる沈澱、界面活性剤による分画、沈澱、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーなどの公知の手段によって生成したヒアルロン酸を精製する。

次に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれによりなんら限定されるものではない。

#### 実施例1

液糖15.0%(コーンスターチに100℃で5分スピターゼを反応させ更に60℃で2日間アミログロシダーゼを反応させたもの)、酵母エキス0.2%、ペプトン2.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、チオ硫酸ソーグ0.2%、亜硫酸ソーグ0.003%を含むpH7.4の液体培地2ℓを3ℓ容ジャーファントナーに分注し、120℃、15分間滅菌処理後、前培養したストレプトコッカス・ズーエビデミカスH-8254を20ml接種し、pH6.8、32℃で4日間通気攪拌(通気量2ℓ/min、回転数200~650rpm)培養した。

培養終了後の培養液より、菌体およびその他の

デミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)、パスツレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)などがあげられる。

培養に用いる培地組成成分は、通常の培養液の成分を用いればよく、また該培養液の1成分として、血清、硫酸マグネシウムを添加してもよい。該培養液を具体的に示すと、例えば液糖(澱粉をアミラーゼで分解したもの)15.0%、酵母エキス0.2%、ペプトン2.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、チオ硫酸ソーグ0.2%、亜硫酸ソーグ0.03%を含むpH5.5~8.5の成分の培養液を用いることができる。(ただし以上の%は重量/容量%である。)

本発明のヒアルロン酸製造は、まず培養液を加圧蒸気滅菌等で滅菌後、ついでヒアルロン酸生産菌を培養液に接種したのち、通気攪拌し、温度25~40℃、好ましくは30~35℃にて、pHを6.5~8.0、好ましくは6.8に自動制御して培養する。

上述の条件で2~4日間培養したのち、該培養液を遠心分離もしくは濾過によって除菌し該濾液を限外濾過もしくは透析することにより低分子量

きょう雑物を除去、得られた上澄液に希塩酸を加えてpHを4.0に調整し、中空糸限外濾過器にて濃縮し、さらにイオン交換水にて透析した。ついでエチルアルコールによる沈澱分別、界面活性剤による分画沈澱、イオン交換クロマトグラフィー等の公知の方法にて精製し、溶液を凍結乾燥して培養液1ℓより5.8gのヒアルロン酸ナトリウムの白色粉末を得た。培養終了時の全培養液(2ℓ)からは11.2g(5.8g/L×2ℓ)の収量であった。この場合の培養液の粘度は最高1750センチポイズまで増大した。一方培養12時間以降滅菌水を連続的に供給し粘度の増大を200~600センチポイズの範囲に制御した培養の場合には培養液1ℓより5.8gのヒアルロン酸ナトリウムの白色粉末を得、培養終了時の全培養液(2.52ℓ)からは14.62g(5.8g/ℓ×2.52ℓ)の収量であった。

#### 実施例2

実施例1に於いて使用した培地中の液糖量を7.5%におきかえた培地を用いてストレプトコッカス・ズーエビデミカスH-8254を実施例1と同

様の方法で培養した場合は4.02g/L、全培養液(2.05ℓ)からは8.24g(4.02g/L×2.05ℓ)であった。この場合の培養液の粘度は最高1350センチポイズまで増大した。一方、培養12時間以降滅菌水を連続的に供給し粘度の増大を200~600cpの範囲に制御した場合には実施例1と同様の処理精製を行い培養液1ℓより4.36gのヒアルロン酸ナトリウムの白色粉末を得、全培養液(2.3ℓ)からは10.0g(4.36g/ℓ×2.3ℓ)の収量であった。また、培養12hr 以降滅菌水の代わりに40%蔗糖溶液におきかえて連続的供給方法で培養液の粘度の増大を250~650センチポイズの範囲に制御した場合には培養液1ℓより6.32gのヒアルロン酸ナトリウムの白色粉末を得た。全培養液(2.65ℓ)からは16.7g(6.32g/ℓ×2.65ℓ)の収量であった。

#### 発明の効果

本発明によれば、ヒアルロン酸を効率よく生産することができる。

特許出願人 明治製菓株式会社

#### 第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 19/26  
C 12 R 1:46)

⑦発明者	魚谷	和道	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑦発明者	佐藤	篤行	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑦発明者	深津	俊三	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑦発明者	岡田	明	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内